

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平10-504708

(43)公表日 平成10年(1998)5月12日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C 12 N 9/96

G 01 N 33/531  
33/532

識別記号

F I

C 12 N 9/96

G 01 N 33/531  
33/532

B

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁)

(21)出願番号 特願平8-502799  
(86) (22)出願日 平成7年(1995)6月23日  
(85)翻訳文提出日 平成8年(1996)12月20日  
(86)国際出願番号 PCT/E P 9 5 / 0 2 4 4 6  
(87)国際公開番号 WO 9 6 / 0 0 2 8 4  
(87)国際公開日 平成8年(1996)1月4日  
(31)優先権主張番号 P 4 4 2 1 9 0 7. 5  
(32)優先日 1994年6月24日  
(33)優先権主張国 ドイツ (DE)  
(31)優先権主張番号 1 9 5 1 1 9 4 0. 1  
(32)優先日 1995年3月31日  
(33)優先権主張国 ドイツ (DE)

(71)出願人 ベーリング・ダイアグノスティツクス・ゲゼルシヤフト・ミット・ベシユレンクテル・ハフツング  
ドイツ連邦共和国マルブルク/ラーン (番地なし)  
(72)発明者 ノイエンホーフナー, シュテファン  
ドイツ連邦共和国デー-35037 マルブルク. ローテンベルク19  
(72)発明者 ケスマルカー, ラインハルト  
ドイツ連邦共和国デー-35041 マルブルク. ヘーエンヴェーク 2エー  
(74)代理人 弁理士 高木 千嘉 (外2名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 加水分解感受性分子または分子部分を安定化する方法

(57)【要約】

本発明は、加水分解感受性の分子または分子部分、とくに水溶液中において加水分解感受性標識または標識含有トレーサーを安定化する方法に関する。本発明はまたこの提案された方法を使用して免疫学的アッセイを行うキットに関する。

【特許請求の範囲】

- 分子または分子部分の水溶液に、分子または分子部分に向けられた抗体を添加することからなる、水溶液中における加水分解感受性分子または分子部分を安定化する方法。
- 加水分解感受性分子または加水分解感受性分子部分は免疫学的検出方法において用いられる標識である請求項1に記載の方法。
- 標識はルミネッセンス、蛍光、リン光、化学ルミネッセンス、生物ルミネッセンス、吸光またはエレクトロルミネッセンスを発生できる基である請求項2に記載の方法。
- 標識はアクリジニウムエステル、アクリジニウムアシルスルホンアミド、ルミノール、イソルミノールまたはそれらの誘導体、ジオキセタン、ルシフェリン、シュウ酸エステルまたはシュウ酸アミドである請求項3に記載の方法。
- 分子、分子部分または標識に対する抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、(半)合成抗体、抗体フラグメントまたは化学的に修飾された抗体もしくは化学的に修飾された抗体フラグメントである請求項1～4のいずれかに記載の方法。
- 加水分解感受性分子または加水分解感受性分子部分およびそれに向けられた安定化抗体からなるキット。
- 安定化すべき分子部分は標識である請求項6に記載のキット。
- 免疫学的検出方法において用いられる請求項7に記載のキット。
- 免疫学的検出方法は、被検物質誘導体もしくは抗体のいずれかが標識を有する被検物質誘導体および抗体、ならびに標識に向けられている抗体からなる競合免疫学的検出方法である請求項8に記載のキット。
- 免疫学的検出方法は、被検物質に向けられた2種の抗体、すなわち被検物質の異なるエピトープに結合し、抗体の一方は標識を有する2種の抗体、およびその標識に向けられた抗体から構成されるサンドイッチアッセイである請求項8に記載のキット。
- 分子、分子部分または標識に向けられている抗体はモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、(半)合成抗体、抗体フラグメントである請求項9に記載のキット。

リクローナル抗体、キメラ抗体、(半)合成抗体、抗体フラグメントまたは化学的に修飾された抗体もしくは化学的に修飾された抗体フラグメントである請求項6～10のいずれかに記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

### 加水分解感受性分子または分子部分を安定化する方法

本発明は、加水分解感受性の分子または分子部分を安定化する方法に関する。本発明はとくに、水溶液中において、加水分解感受性標識および標識含有トレーサーを安定化する方法に関する。

免疫学的検出方法は、インビトロ診断において極めて重要になっている。この理由は、それらが高度に特異的で、また極めて高感度であることによる。さらにこれらの方法は、操作が簡単なことが特徴的である。検出方法は検出すべき被検物質とその結合パートナーの1種または複数種の間の免疫学的相互反応に基づいている。

サンドイッチアッセイの場合、被検物質は2つの異なる抗体によって、サンドイッチ様式で結合される。2種の抗体の一方は標識を有し、それにより、その濃度、すなわちサンドイッチ複合体の濃度を測定することができる。サンドイッチ法は小さな被検物質には適用できない。立体的な理由により2つの異なる抗体が同時に被検物質に結合できないからである。このような場合には一般的に、競合アッセイが用いられる。これらのアッセイにおいては、被検物質と被検物質の合成分導体が抗体上の結合部位で競合する。一般に、被検物質誘導体（古典的な競合法）または抗体のいずれかが標識される。

慣用の標識は、たとえば、放射性同位元素または発光性（蛍光、リン光、化学ルミネッセンス、生物ルミネッセンス等）物質もしくは吸光可能な物質である。標識試薬（抗体、被検物質誘導体）は以下、トレーサーと呼ぶ。

トレーサーは、そのまま使用できる水溶液中に保存されることが多い。標識は多くの場合、加水分解に抵抗性のない物質であるから、水溶液中

での保存では、一般に意に反した安定性の限界が生じる。これはとくに、保存期間が長くなるに従って測定されるシグナル高が低下することによって明らかである。この結果、完全なキットの貯蔵寿命は短くなることが多い。

本発明はしたがって、分子、分子部分およびとくに免疫学的検出方法において標識として用いられる物質の加水分解に対する感受性を低下させる方法を見出す

という技術的問題に基づくものであった。

この技術的問題は、請求の範囲において定義される実施態様の提供によって解決される。驚くべきことに、安定化すべき分子、分子部分、または標識に対する抗体の添加は、上記物質の加水分解に対する感受性を著しく低下させることが見出されたのである。加水分解-保護効果は、恐らく親水性粒子 ( $H_2O$ 、 $OH^-$ 、 $H_3O^+$ ) の攻撃が立体的理由および/または疎水性環境の創成によって遮蔽されるという事実によるものと考えられる。この種の加水分解-保護効果は、加水分解に感受性の分子、分子部分または標識に対する抗体の存在が本発明による方法の実施を可能にするものである限り、原理的にこれらのすべての加水分解感受性物質に及ぶものである。

本発明は、したがって、水溶液中の加水分解-感受性分子または分子部分を安定化する方法において、その分子または分子部分の水溶液にその分子または分子部分に対する抗体を添加することからなる方法に関する。「安定化」の語は、本発明の関連では、分子、分子部分または標識の加水分解が防止されるかまたは減速されることを意味する。「分子」の語は、化学結合によって互いに保持される同種もしくは異種の2個または3個以上の原子から構成される粒子を意味する。この用語には、本発明の関連では、その分子のイオンまたはラジカルも包含される。「分

子部分」の語は、完全な分子からの放出によって生成可能なこの分子の部分を意味する。「加水分解-感受性」の語は、本発明の関連では、化合物、この場合は分子、分子部分、標識またはトレーサーが、望ましくない生成物、すなわち最早シグナルを産生できないかまたはシグナルを産生する限られた能力しかもたない生成物を導く  $H_2O$  よび/または  $H_3O^+$  よび/または  $OH^-$  が関与する化学反応を受ける能力を意味する。

「抗体」の語はモノクローナルまたはポリクローナル抗体を意味する。本発明の関連では、この語はキメラ抗体、二特異性抗体、抗体フラグメント〔たとえば  $(Fab')_2$  〕、 $Fab$ 、 $Fv'$ 、(半)合成および化学的に修飾された抗体または抗体フラグメントも包含する。

本発明の方法によれば、抗体が向けられた加水分解-感受性分子または分子部分の水溶液中における安定性を著しく増大させることが可能になる。

本発明はとくに、免疫学的検出方法において用いられる標識の安定化方法に関する。「標識」の語は、本発明の関連では、標識、マーカーまたは分子形態でのシグナル放射体を意味する。この標識はルミネッセンス、蛍光、リン光、化学ルミネッセンス、生物ルミネッセンスまたはエレクトロルミネッセンスを発生できる基とすることができます。標識はとくに、アクリジニウムエステル、アクリジニウムアシルスルホンアミド、ルミノールまたはその誘導体、イソルミノールまたはその誘導体、ジオキセタン、ルシフェリン、シュウ酸エステルまたはシュウ酸アミドである。したがって、本発明の方法は、標識を有し、たとえば検出方法、とくに免疫学的検出方法に使用できるトレーサーの安定性を著しく増大させることを可能にする。

本発明はさらに、加水分解-感受性分子または加水分解-感受性分子部分およびそれに対する安定化抗体から構成されるキットに関する。本発明はとくに、安定化すべき分子部分が標識であるか、または安定化すべき分子がトレーサーであるキットに関する。本発明のキットは、好ましくは免疫学的検出方法において使用される。とくに好ましい実施態様においては、本発明は、被検物質誘導体および抗体からなり、被検物質誘導体または抗体のいずれかが標識を有し、抗体は標識に向けられている、競合免疫学的検出方法を実施するためのキットに関する。他のとくに好ましい実施態様においては、本発明は、被検物質に向けられた2種の抗体、すなわち被検物質の異なるエピトープに結合し、抗体の一方は標識を有する2種の抗体、およびその標識に向けられた抗体から構成される、サンドイッチアッセイを実施するためのキットに関する。

被検物質に対する抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、合成または半合成起源のいずれであってもよい。最後に、本発明は、分子、分子部分または標識に対する抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、合成または半合成抗体、抗体フラグメント、化学的に修飾された抗体または化学的に修飾された抗体フラグメントである上記定義によるキットに関する。

以下の実施例は本発明を例示するものである。

実施例 1

抗-P S A トレーサーの安定化

工程 1：発光原アクリジニウムアシルスルホンアミド標識に対するモノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体の調製のため、BALB/cマウスに、フロイント完全アジュバント中に乳化した10  $\mu$ gのアクリジニウムアシルスル

ホンアミド-P S Aの皮下または腹腔内注射を行った。これらに続いて、アジュバントを用いないでさらに4～5回の免疫処置を行った（いずれの場合も4週間の間隔で）。マウスには、融合前の最後の4日間、再免疫処置を静脈内に行った（10  $\mu$ g/日）。

ハイブリドーマの調製のため、免疫処置された動物を頸部脱臼によって屠殺した。脾臓を無菌条件下に採取し、脾臓細胞の単一細胞懸濁液を得るために、無血清ダルベッコ改良イーグル培地（DMEM）中で破碎した。細胞を遠心分離によって収集し（5分間；1800rpm）、DMEM中で1回洗浄した。細胞の総数をトリプル一排除法を用い血球計測器により計数して測定した。融合パートナーとして用いたマウス骨髄腫細胞（Sp2/0）は無血清DMEM中で2回洗浄し、遠心分離によって収集し（10分間、1000rpm）、脾臓細胞について上述したようにして計数した。

約10<sup>8</sup>個の脾臓細胞を2×10<sup>7</sup>個のSp2/0マウス骨髄腫細胞と混合した。1000rpmで10分間遠心分離したのち上清を除去し、容器中のペレットに1mlのポリエチレンギリコール（PEG 4000, Merck, 50%）を添加した。ついでペレットを穂やかにタッピングして再懸濁し、37℃で1分間インキュベートした。穂やかにタッピングしながら10mlの無血清DMEMを滴下して加え、混合物を2～4分間インキュベートした。融合細胞をついで1000rpmにおいて10分間遠心分離した。得られた細胞ペレットを、20%ウシ胎児血清（FCS）ならびにHAT（ヒポキサンチン0.1mM；アミノブテリン0.4  $\mu$ M；チミジン16  $\mu$ M）一含有DMEM中に再懸濁し、24ウエル付き培養プレート（Nunc）上、各ウエルあたり約

$5 \times 10^4 \sim 10^6$ 細胞の濃度で平板培養した。2～3週間後、単一細胞コロニーを各ウエルから採取し、新しい培養プレートのウエル内で培養した。

培養上清を、EIA法により抗原特異的抗体についてスクリーニングした。アクリジニウム-BSA (3  $\mu$ g/ml) でコートしたマイクロタイタープレートの各ウエルに上清 100  $\mu$ lを負荷し、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、ウサギ-抗-マウス抗体-POD接合体 100  $\mu$ lを加え、室温にさらに1時間放置した。基質とともに30分間インキュベートしたのち、発色をBehring-ELISA-プロセッサー (BEP) により492 nmにおいて測定した。適当な抗原特異性を有する抗体を産生するハイブリドーマを選択し、単一細胞マニピュレーターを用いてクローニングした。大量のモノクローナル抗体を調製するため、クローニングにより増殖させた。各モノクローナル抗体の以下の精製はプロテインAクロマトグラフィーによって行った。

#### 工程2：抗-PSAトレーサーの調製

0.1 mgの抗-PSA MAb [前立腺特異的抗原 (PSA) に対するモノクローナル抗体；たとえばBW 92-284/03, Behringwerke AG] を0.1モルリン酸緩衝液 (pH 8.0) 0.7 ml中に溶解した。この溶液に30  $\mu$ lの標識溶液 [アセトニトリル 1 mlあたり0.1 mgのアクリジニウムアシルスルホンアミド (N-スクシンイミジル反応基を有する) を含有] を添加し、反応溶液を室温で15分間インキュベートした。ついで0.3 mlのリジン水溶液 (10 mg/ml) を添加し、インキュベーションを15分間継続した。トレーサーはゲルクロマトグラフィーによって精製した (Sephadex G 25)。

精製されたトレーサーを最終的に、0.05 M トリス塩酸塩緩衝液 (pH 7.4; 1 リットルあたりウシ血清アルブミン 2 g, NaCl 8.8 g およびナトリウムアジド 0.5 g 含有) 中 600 ng/ml の濃度で溶解した。

#### 工程3：トレーサー溶液の安定化

トレーサー溶液A：安定化のために、抗-標識抗体 (工程1で得られたBW 90-9/016, DSM ACC 2183) を1  $\mu$ g/mlの濃度で、トレーサー溶液 (工程2) に添加

した。

トレーサー溶液B：比較溶液には抗一標識抗体を添加しなかった。

#### 結果

トレーサー溶液AおよびBを37°Cで5週間保存したのちに、トレーサー溶液Aの場合は初期のシグナル活性は事実上不变であり、トレーサー溶液Bの場合は87%の低下を示した(図1)。

#### 実施例 2

##### 抗-T3トレーサーの安定化

工程1：発光原アクリジニウムアシルスルホンアミド標識(EP-A-0 257 541、およびEP-A-0 330 050)に対するモノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は例1の工程1に説明した方法によって調製した。

##### 工程2：抗-T3トレーサーの調製

0.1mgの抗-T3 Ma b、甲状腺ホルモンのトリヨードサイロニン(T3)に対するモノクローナル抗体(ImmunoGen International Ltd. 注文番号 13-3 D8-38, Gateshead, UK)を0.1モルリン酸塩緩衝液(pH 8.0)0.7ml中に溶解した。この溶液に5μlの標識溶液[アセトニトリル1mlあたり1.0mgのアクリジニウムアシルスルホンアミド(N-スクシンイミジル反応基を有する)を含有]をピペットで添加し、反応溶液を室温にて15分間インキュベートした。ついで、0.3mlのリジン水溶液(10mg/ml)を加え、15分間インキュベーションを継続した。トレーサーはゲルクロマトグラフィー(Sephadex G 25)によっ

て精製した。

##### 工程3：トレーサー溶液の調製

精製したトレーサー(工程2)を0.05Mトリス塩酸塩緩衝液(pH7.4; 1リットルあたりウシ血清アルブミン2g、NaCl 8.8g、ANS(8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸)0.25gおよびナトリウムアジド0.5g含有)中に90ng/mlの濃度で溶解した。

##### 工程4：トレーサー溶液の安定化

トレーサー溶液A：安定化のために、抗一標識抗体(BW 90-9/016, DSM ACC 21

83) を  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、トレーサー溶液（工程 3）に添加した。

トレーサー溶液 B：比較溶液には抗一標識抗体を添加しなかった。

#### 結果

図 2 には、37°Cで4週間保存後の2種類のトレーサーで得られた標準プロットを示す。シグナル高はトレーサー溶液 A の方がトレーサー溶液 B に比べて明らかに高かった。

#### 実施例 3

##### T 3 トレーサーの安定化

工程 1：発光原アクリジニウムスルホンアミド標識 (EP-A-0 257 541, および EP-A-0 330 050) に対するモノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は例 1 の工程 1 に説明した方法によって調製した。

工程 2：T 3 トレーサーの調製

4.0 mg のウサギ IgG を、PBS 緩衝液、pH 7.2 に溶解し、これに 0.2 mL iBO<sub>3</sub> 溶液 (20% ジオキサンを含有する水溶液) 8 ml ならびに GMS 溶液 (ジオキサン中 10 mg/ml の  $\gamma$ -マレイミド酪酸 N-アス

クシンイミジルエスチル溶液) 0.22 ml を添加した。室温に 1 時間放置したのち塩を Biogel P2 カラムによって除去した。得られた溶出液（「溶液 1」）の容量は約 2.0 ml であった。

6.9 mg のトリヨードサイロニン (T 3) を 0.69 ml の DMSO に溶解した。0.1 ml の DMSO 中に溶解した 10  $\mu\text{l}$  の N-エチルモルホリンおよび 2.1 mg の SAMSA (S-アセチルメルカブト無水コハク酸) を添加した。30 分後に、ピペットで 1 M ヒドロキシルアミン水溶液 0.1 ml を加えた。この溶液（「溶液 2」）を室温で 15 分間インキュベートした。溶液 1 および溶液 2 を混合し、3 ml の DMSO を添加した。2 時間後に、塩を Biogel P2 カラムによって除去し、接合体を凍結乾燥した。

0.1 mg の IgG-T 3 接合体を 0.1 モルリン酸緩衝液 (pH 8.0) 0.7 ml に溶解した。この溶液に 10  $\mu\text{l}$  の標識溶液 [アセトニトリル 1 ml あたり 0.1 mg のアクリジニウムアシルスルホンアミド (N-スクシンイミジル反応性基を有する)]

を含有] をピペットで添加し、反応溶液を室温にて 15 分間インキュベートした。ついで、0.3 ml のリジン水溶液 (10mg/ml) を加え、15 分間インキュベーションを継続した。トレーサーはゲルクロマトグラフィー (Sephadex G 25) によって精製した。

#### 工程 3：トレーサー溶液の調製

精製したトレーサー (工程 2) を 0.05 M トリス塩酸塩緩衝液 (pH7.4; 1 リットルあたりウシ血清アルブミン 2 g、NaCl 8.8 g、ANSO.25 g およびナトリウムアジド 0.5 g 含有) 中に 30 ng/ml の濃度で溶解した。

#### 工程 4：トレーサー溶液の安定化

トレーサー溶液 A：安定化のために、抗一標識抗体 (BW 90-9/016,

DSM ACC 2183) を 1 μg/ml の濃度で、トレーサー溶液 (工程 3) に添加した。

トレーサー溶液 B：比較溶液には抗一標識抗体を添加しなかった。

#### 結果

図 3 には、37°C で 4 週間保存後の 2 種類のトレーサーで得られた標準プロットを示す。シグナル高はトレーサー溶液 A の方がトレーサー溶液 B よりも明らかに高かった。

#### 実施例 4

##### 各種抗一標識抗体の比較

検討した抗一標識抗体の一部は、トレーサーの安定化能の点で (図 4 a) および発光動態に関して極めて多様な挙動を示した。図 4 b は各種抗一標識抗体からの光収率を測定時間の関数として示す。

以下に記載のハイブリドーマは DSM, Braunschweig に寄託された。このハイブリドーマにより產生される抗体の名称はハイブリドーマの名称に相当する。

ハイブリドーマ	DSM 寄託番号	寄託日
BW 90-342-9-016	2183	1974年 7月 21日

#### 図面の説明

図 1：抗標一識抗体を添加した場合および添加しない場合の 37°C で保存後に

おける抗-P S Aトレーサーのシグナル安定性。R L Uは相対光単位を意味する。

図2: 37°Cで4週間保存されたトレーサーにより実施した、T 3 S P A L T (固相抗原ルミネッセンス法) アッセイ。S P A L Tアッセイは標識された被検物質誘導体 (=被検物質トレーサー) が標識された抗体 (抗体トレーサー) 上の結合部位で測定すべき被検物質と競合する。

競合ルミネッセンスイムノアッセイである。

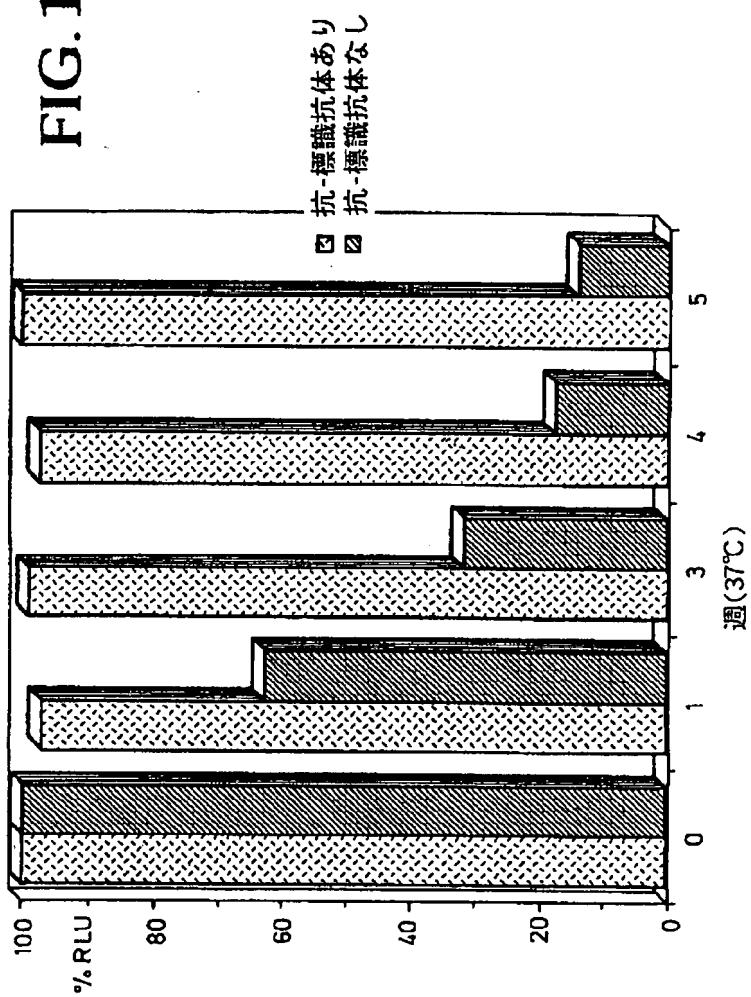
図3: 37°Cで4週間保存されたトレーサーにより実施した、T 3 L I A (ルミネッセンスイムノアッセイ)。L I Aは標識された被検物質誘導体 (=被検物質トレーサー) が抗体 (この場合、固相に結合されている) 上の結合部位で測定すべき被検物質と競合する競合ルミネッセンスイムノアッセイである。

図4 a: 各種抗-標識抗体の様々な安定化効果。

図4 b: 添加されたモノクローナル抗-標識抗体の関数としての抗-P S Aトレーサーからの光収率。

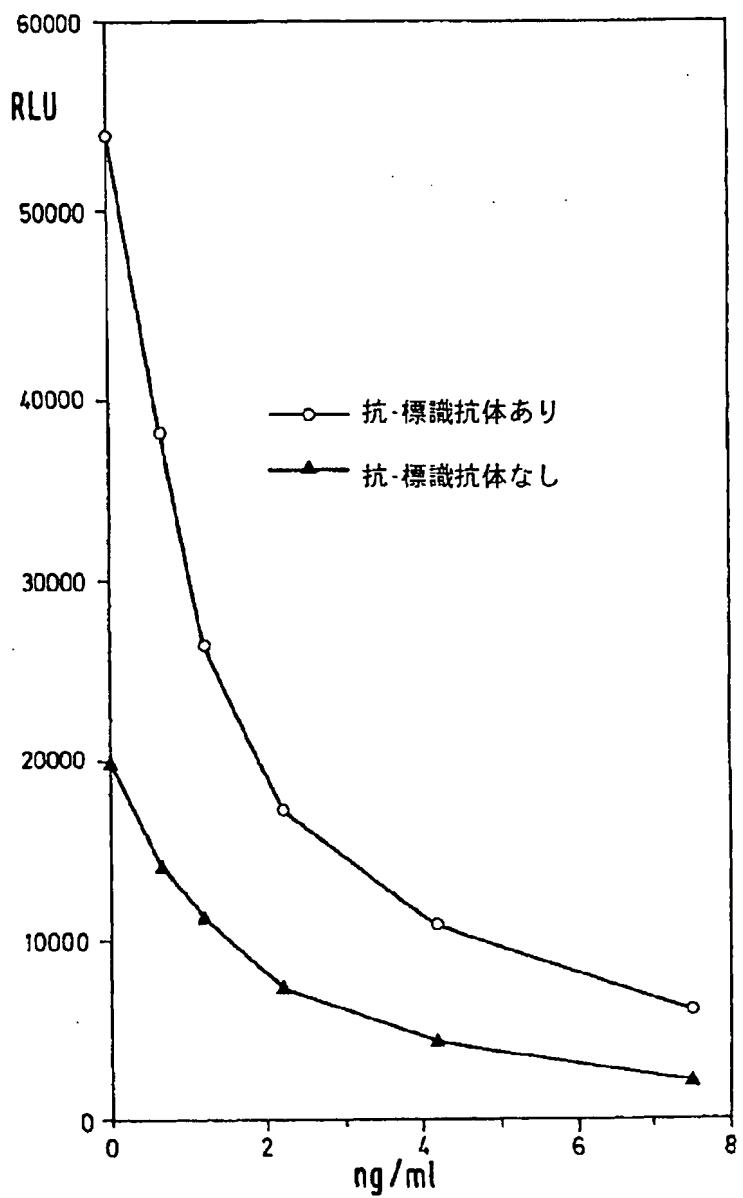
【図1】

FIG. 1



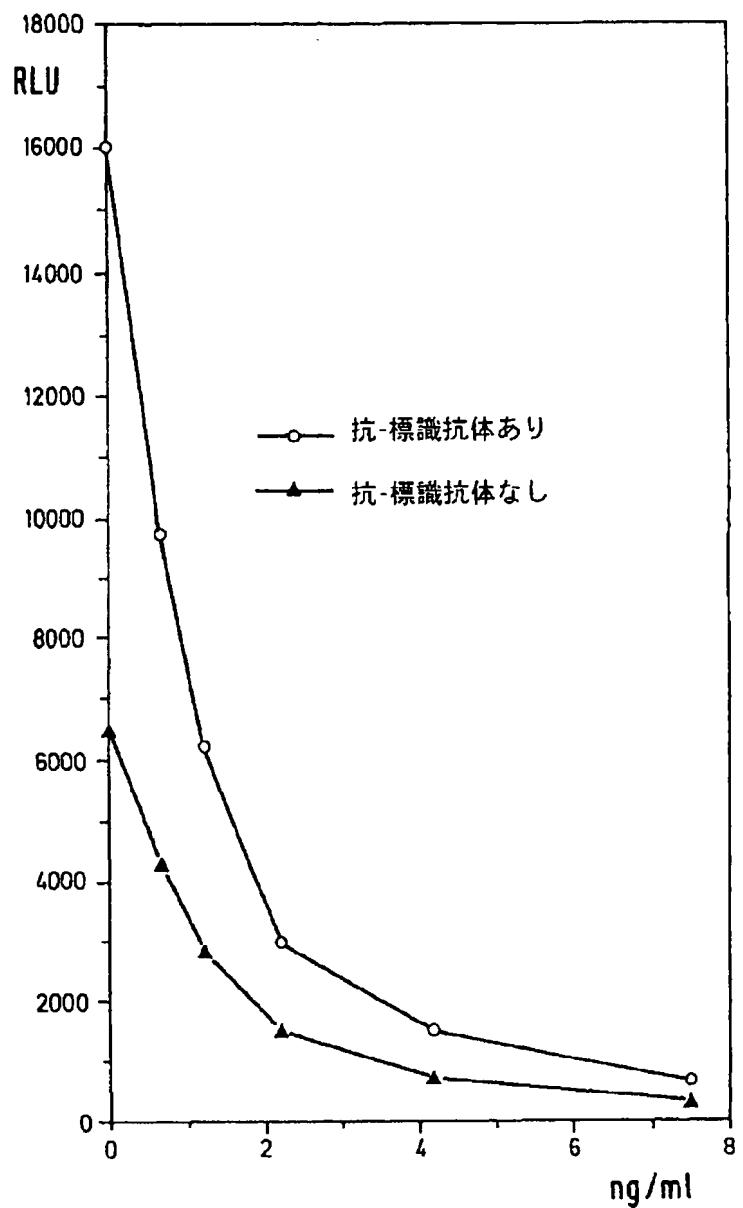
【図2】

FIG.2



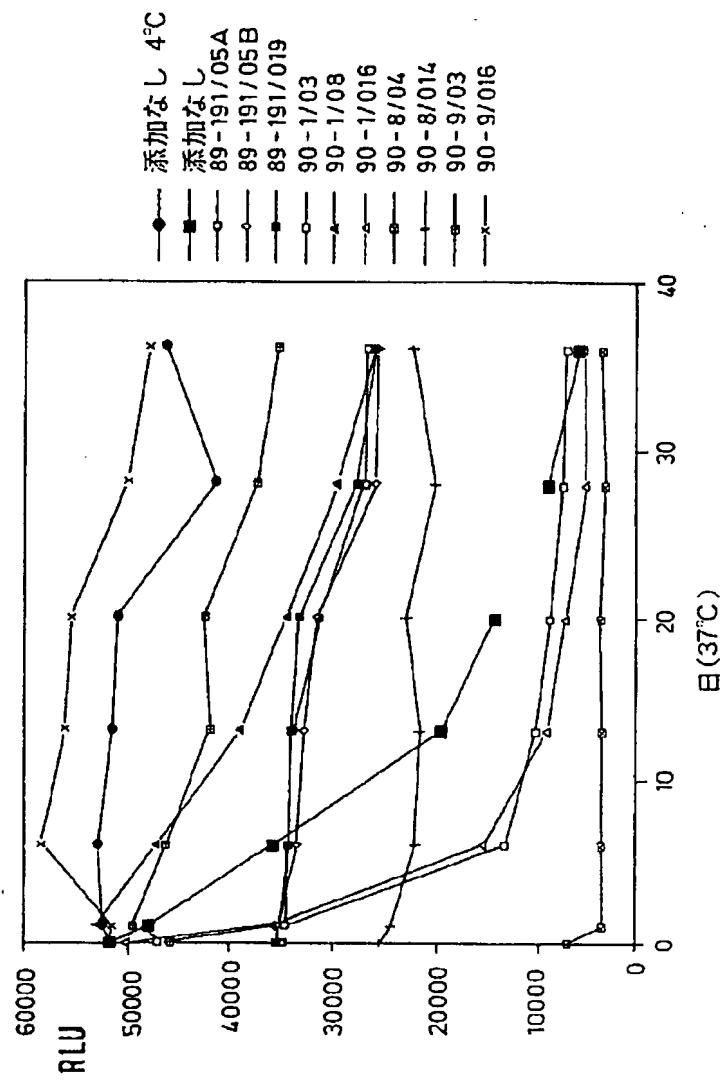
【図3】

FIG.3



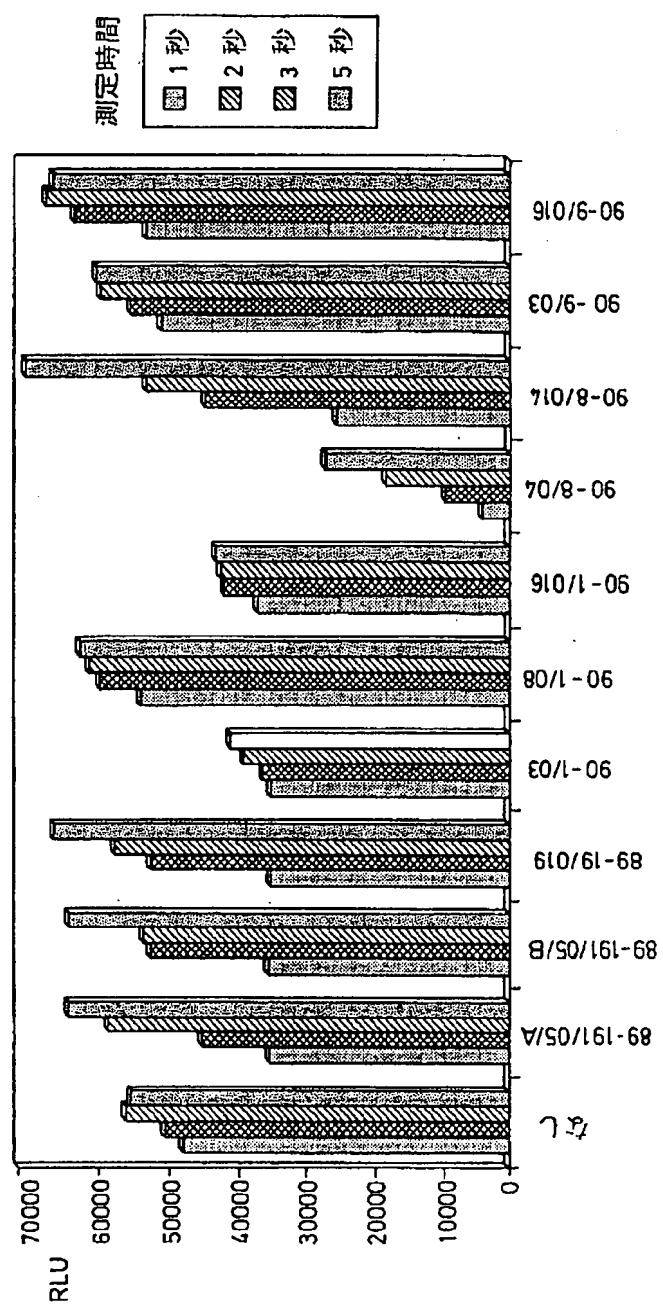
【図4】

FIG. 4 a



【図4】

FIG. 4b



【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1996年7月24日

【補正内容】

請求の範囲

1. 水溶液中における加水分解感受性分子または分子部分を安定化する方法において、分子または分子部分の水溶液に、分子または分子部分に向けられた抗体を添加することからなり、この場合、分子または分子部分は酵素またはそれらの部分を意味しない方法。
2. 加水分解感受性分子または加水分解感受性分子部分は免疫学的検出方法において用いられる標識である請求項1に記載の方法。
3. 標識はルミネッセンス、蛍光、リン光、化学ルミネッセンス、生物ルミネッセンス、吸光またはエレクトロルミネッセンスを発生できる基である請求項2に記載の方法。
4. 標識はアクリジニウムエステル、アクリジニウムアシルスルホンアミド、ルミノール、イソルミノールまたはそれらの誘導体、ジオキセタン、ルシフェリン、シュウ酸エステルまたはシュウ酸アミドである請求項3に記載の方法。
5. 分子、分子部分または標識に対する抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、(半)合成抗体、抗体フラグメントまたは化学的に修飾された抗体もしくは化学的に修飾された抗体フラグメントである請求項1～4のいずれかに記載の方法。
6. 加水分解感受性分子または加水分解感受性分子部分およびそれに向けられた安定化抗体からなり、この場合、分子または分子部分は酵素またはそれらの部分を意味することを意図しないキット。
7. 安定化すべき分子部分は標識である請求項6に記載のキット。
8. 免疫学的検出方法において用いられる請求項7に記載のキット。
9. 免疫学的検出方法は、被検物質誘導体もしくは抗体のいずれかが標識を有する被検物質誘導体および抗体、ならびに標識に向けられてい

る抗体からなる競合免疫学的検出方法である請求項8に記載のキット。

10. 免疫学的検出方法は、被検物質に向けられた2種の抗体、すなわち被検物質の異なるエピトープに結合し、抗体の一方は標識を有する2種の抗体、およびその標識に向けられた抗体から構成されるサンドイッチアッセイである請求項8に記載のキット。
11. 分子、分子部分または標識に向けられている抗体はモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、(半)合成抗体、抗体フラグメントまたは化学的に修飾された抗体もしくは化学的に修飾された抗体フラグメントである請求項6～10のいずれかに記載のキット。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No  
PCT/EP 95/02446A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N9/96 G01N33/532 G01N33/58 G01N33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 487 301 (SYNTEX (U.S.A.) INC.) 27 May 1992	1,2,5-11
Y	see the whole document	3,4
Y	WO,A,93 20074 (ABBOTT LABORATORIES) 14 October 1993	3,4
Y	see the whole document	3,4
Y	US,A,5 302 533 (L. J. KRICKA) 12 April 1994	3,4
	see the whole document	
	---	
		-/-/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 October 1995

Date of mailing of the international search report

30. 10. 95

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.O. SB18 Patentstaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte: 1 Application No  
PCT/EP 95/02446

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 91, no. 9,  27 August 1979  Columbus, Ohio, US;  abstract no. 71265,  R. D. NARRESSI ET AL. 'Use of antibodies  against the label in non-separation  non-isotopic immunoassay: 'indirect  quenching' fluorimmunoassay of proteins.'  page 305; column 1;  see abstract  &amp; J. IMMUNOL. METHODS,  vol. 26, no. 4, 1979  pages 307-313,  -----</p>	3

Form PCT/ISA/110 (continuation of second sheet) (July 1992)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No

**PCT/EP 95/02446**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-487301	27-05-92	CA-A-	2055812	21-05-92
		JP-A-	4335888	24-11-92
WO-A-9320074	14-10-93	AU-B-	3936393	08-11-93
US-A-5302533	12-04-94	NONE		

Form PCT/ISA/318 (patent family annex) (July 1992)

---

フロントページの続き

(81) 指定国 E P (A T, B E, C H, D E,  
D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M  
C, N L, P T, S E), A U, C A, J P, K R, M  
X, U S

(72) 発明者 ヴアルター, ゲツ  
ドイツ連邦共和国デー-35274 グロース  
ゼルハイム. シュロセルシュトラーセ 3

(72) 発明者 ハルトウス, ハンス-ペーター  
ドイツ連邦共和国デー-35041 マルブル  
クーヴェーアダ. アウフデアイエホ 8

(72) 発明者 ナウ, ギュンター  
ドイツ連邦共和国デー-35043 マルブル  
クーシュレク. コルピングシュトラーセ 4

(72) 発明者 スクルツイプチク, ハインツ-ユルゲン  
ドイツ連邦共和国デー-63263 ノイ-イ  
ーゼンブルク. フォルストハウスヴェーク  
11

(72) 発明者 モルツ, ペーター  
ドイツ連邦共和国デー-55118 マインツ.  
カイザーヴィルヘルムーリング 44

(72) 発明者 マドリ, ノルバート  
ドイツ連邦共和国デー-35041 マルブル  
ク. ヘーエンヴェーク 68